

## DIFFERENTIAL-MOTION DETECTING METHOD OF MATERIAL TO BE SENSED

Patent Number: JP5288672  
Publication date: 1993-11-02  
Inventor(s): YONEDA KATSUMI; others: 02  
Applicant(s): NIPPON LASER DENSHI KK  
Requested Patent:  JP5288672  
Application Number: JP19920084091 19920406  
Priority Number(s):  
IPC Classification: G01N21/27; G01N21/55  
EC Classification:  
Equivalents:

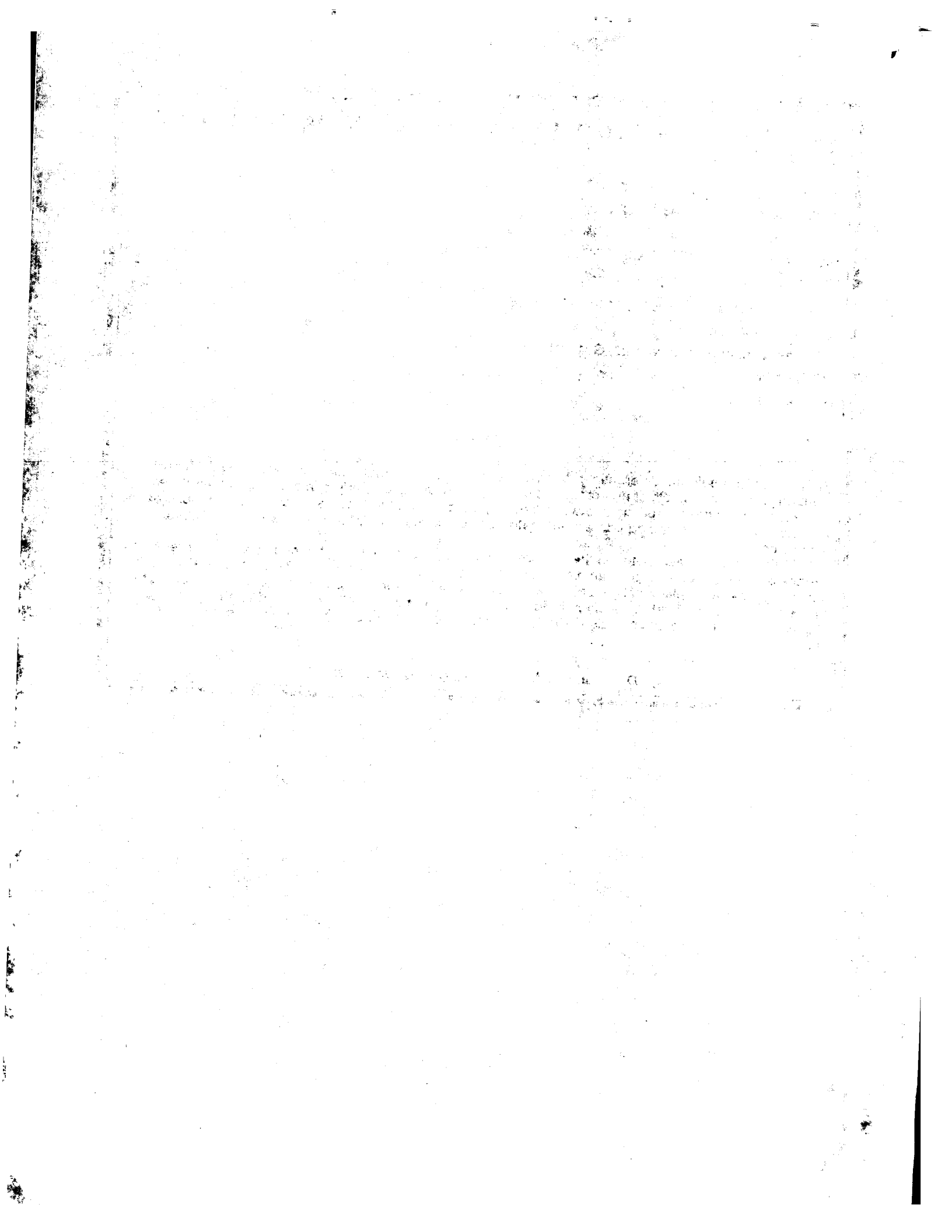
---

### Abstract

---

**PURPOSE:**To obtain the differential-motion detecting method for material to be sensed, which can compensate for the effects of non-singular bonding, the physical property of a sample, temperature and the like, can observe the reaction between sensing material and the material to be sensed in accordance with the elapse of time and can detect the material to be sensed in sample liquid accurately without much labor and cost.

**CONSTITUTION:**A glass plate, on the surface of which a gold thin film is attached, is stuck to the bottom surface of the main body of a prism by using matching oil. Passed light beams 211, which are split with a beam splitter 2, and reflected light beams 222 are cast into a reference part R and a sensing part S, to which antibodies are fixed at specified incident angles. Antigens are detected based on the displacement of the electric signals  $(I_s - I_r)/I_m$  of an operator 9 before and after serum is spread and attached.



(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 5 - 2 8 8 6 7 2

(43) 公開日 平成5年(1993)11月2日

(51) Int. Cl. <sup>s</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 21/27	C	7370-2 J		
21/55		7370-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数 1

(全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平4-84091

(22) 出願日 平成4年(1992)4月6日

(71) 出願人 000230467  
日本レーザ電子株式会社  
愛知県名古屋市天白区保呂町2318

(72) 発明者 米田 勝実  
名古屋市天白区保呂町2318 日本レーザ電子株式会社内

(72) 発明者 田島 晴雄  
名古屋市天白区保呂町2318 日本レーザ電子株式会社内

(72) 発明者 孫 暁春  
名古屋市天白区保呂町2318 日本レーザ電子株式会社内

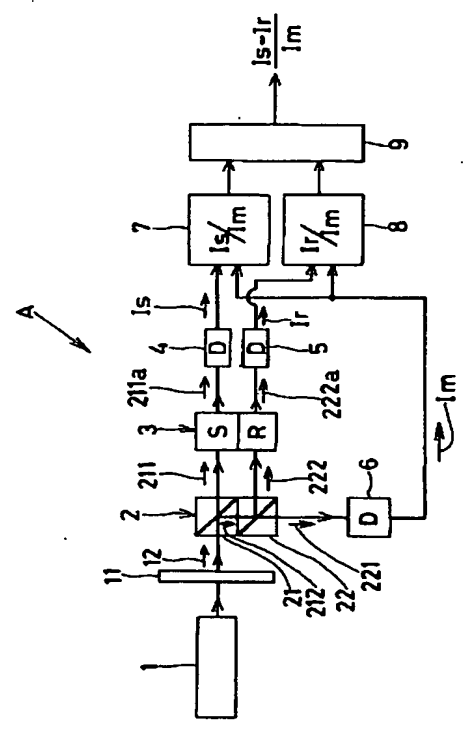
(74) 代理人 弁理士 石黒 健二

(54) 【発明の名称】 被センシング物質の差動検出方法

(57) 【要約】

【目的】 非特異結合、サンプルの物性、温度等の影響を補償し、センシング物質と被センシング物質との反応を時間経過に従って観察する事ができ、且つ、手間やコストが著しくかからず、正確にサンプル液中の被センシング物質を検出することができる被センシング物質の差動検出方法の提供。

【構成】 金薄膜を上面に膜付けしたガラス板をマッチングオイルを用いてプリズム本体の底面に貼着し、ビームスプリッタ2により分割された通過光211、反射光222を所定入射角でもってリファレンス部R及び抗体を固定したセンシング部Sに入射させ、血清を展着させる前と後との、演算器9の電気信号  $(I_s - I_r) / I_m$  の変位に基づいて抗原を検出する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】プリズムの一端面に金属薄膜を膜付けするか、プリズムの一端面に貼着したガラス板の表面に金属薄膜を膜付けし、該金属薄膜上にセンシング物質を固定したセンシング部と固定しないリファレンス部とを有する、表面プラズモンバイオセンサを用い、単一光源から放射されるP偏光の単色光ビームをビームスプリッタにより分割するとともに、これら分割ビームを所定入射角をもって前記センシング部とリファレンス部とに入射させ、被センシング物質を含有する可能性のあるサンプル液を前記センシング部とリファレンス部とに展着させ、展着させる前と後との、前記センシング部とリファレンス部とで反射した各反射光の強度差の変位に基づいて前記サンプル液中の被センシング物質を検出する、被センシング物質の差動検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、金属と誘電物質との境界領域に励起される表面プラズモンを利用したバイオセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】金属薄膜、及び抗体を順に固着した直角プリズムの底面に電磁線を導入し、抗原を含有する可能性のある血清を直角プリズムの底面に展着させ、展着させる前と後との、電磁線の反射率の減衰ディップ点が変位する現象に基づいて抗原の存在を検知する技術が知られている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかるに、従来の技術は以下のような欠点を有する。

(あ) 直角プリズムの底面に血清を展着させた場合、電磁線の反射率の減衰ディップ点が変位するが、この変位と免疫反応による変位との区別が紛らわしい。この為、抗原の検出に手間がかかるとともに、不正確になり易い。

(い) 免疫反応を、時間経過に従って観察する事が困難である。本発明の目的は、非特異結合、サンプルの物性、温度等の影響を補償し、センシング物質と被センシング物質との反応を時間経過に従って観察する事ができ、且つ、手間やコストが著しくかからず、正確にサンプル液中の被センシング物質を検出することができる被センシング物質の差動検出方法の提供にある。

【0004】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するため、本発明は、プリズムの一端面に金属薄膜を膜付けするか、プリズムの一端面に貼着したガラス板の表面に金属薄膜を膜付けし、該金属薄膜上にセンシング物質を固定したセンシング部と固定しないリファレンス部とを有する、表面プラズモンバイオセンサを用い、単一光源か

(2)

ら放射されるP偏光の単色光ビームをビームスプリッタにより分割するとともに、これら分割ビームを所定入射角をもって前記センシング部とリファレンス部とに入射させ、被センシング物質を含有する可能性のあるサンプル液を前記センシング部とリファレンス部とに展着させ、展着させる前と後との、前記センシング部とリファレンス部とで反射した各反射光の強度差の変位に基づいて前記サンプル液中の被センシング物質を検出する構成を採用した。

10 【0005】

【作用】サンプル液をセンシング部とリファレンス部とに展着させると、センシング部とリファレンス部とで反射した各反射光の各強度は展着させる前と後とで変化する。ここで、サンプル液が被センシング物質を含有していない場合、各反射光の強度は同一的に変化するので各反射光の強度差は殆ど変位しない。しかし、サンプル液が被センシング物質を含有していると、各反射光の強度は各々異なって変化するので、各反射光の強度差の変位を検出すればサンプル液中の被センシング物質の存在が確認できる。

【0006】

【発明の効果】センシング物質と被センシング物質との反応を時間経過に従って観察する事ができる。各反射光の強度差の変位を検出するだけなので、バックグラウンドと無関係に、サンプル液中の被センシング物質の、存在の有無または正確な量を、低コストで且つ簡単に知ることができる。

【0007】

【実施例】本発明の一実施例を図1～図4に基づいて説明する。図1に示すごとく、 $\alpha$ -FP（肝臓癌になると血清中に増加するタンパク質）検出装置Aは、レーザ光をP偏光にする偏光板11を備えたレーザ投光器1と、P偏光ビーム12を三等分するビームスプリッタ2と、表面プラズモンバイオセンサ3と、ホトダイオード4、5、6と、 $I_s/I_m$ 回路7と、 $I_r/I_m$ 回路8と、演算器9とを備える。

【0008】レーザ投光器1は、本実施例では、波長632.5nmのレーザ光を投光するHe-Neレーザである。

【0009】ビームスプリッタ2は、P偏光ビーム12を通過光211と反射光212とに分割するとともに、通過光211と反射光212との強度を1:2にする第1スプリッタ部21と、反射光212を通過光221と反射光222とに分割するとともに、通過光221と反射光222との強度を1:1にする第2スプリッタ部22とを備える。

【0010】図2の(a)、(b)に示す表面プラズモンバイオセンサ3は、金薄膜311を上面310に膜付けしたガラス板31(BK7製;  $n=1.5143$ )と該ガラス板31をマッチングオイル32を用いて底面3

31に貼着したプリズム本体33 (BK7製; n=1.5143)とで構成されるプリズム30を備え、後述するL-B膜法により、金薄膜311上に抗体(抗- $\alpha$ -FP)を固定した(図2の(a)の方)センシング部Sと固定しないリファレンス部Rとを形成してなる。

【0011】ホトダイオード4は、通過光211が所定入射角(73°前後)でもってセンシング部Sに入光し、センシング部Sで反射してプリズム本体33外へ出た測定ビーム211aを受光して電気信号Isを出力する光電素子である。

【0012】ホトダイオード5は、反射光222が所定入射角でもってリファレンス部Rに入光し、リファレンス部Rで反射してプリズム本体33外へ出た測定ビーム222aを受光して電気信号Irを出力する光電素子である。

【0013】ホトダイオード6は、通過光221を受光して電気信号Imを出力する光電素子である。

【0014】Is/Im回路7は、電気信号Is、Imから電気信号Is/Imを算出する回路である。

【0015】Ir/Im回路8は、電気信号Ir、Imから電気信号Ir/Imを算出する回路である。

【0016】演算器9は、電気信号Is/Im、Ir/Imから(Is-Ir)/Imを演算する電子回路である。

【0017】表面プラズモンバイオセンサ3(図2の(a)の方)は、以下の様にして製造される(図3参照)。

①ガラス板31を洗浄し、真空中で膜厚50nmの金薄膜311を表面に蒸着させる。

②リン酸塩緩衝液(PBS; 0.1M pH7.2)を満たしたトラフに金薄膜311を表面に蒸着した上記ガラス板31を垂直に沈める。

③上記リン酸塩緩衝液を満たしたトラフにアラキンを展開する。

④展開したアラキンを10mN/mに圧縮する。

⑤沈めたガラス板31をL-B膜法により垂直に引上げ(半分)、アラキンのL-B膜34を膜付けし、図示上半分に位置する金薄膜311に、リファレンス部Rを形成する。

⑥抗 $\alpha$ -FP溶液{0.07mg/ml (1≡dm<sup>-3</sup>)、固定化用緩衝液:リン酸塩緩衝液0.2M (M≡mol dm<sup>-3</sup>) pH7.2}をトラフに注入し、抗体35を吸着(約30分放置)させる。

⑦液面下にあるガラス板31の下半分をL-B膜法により垂直に引上げ、図示下半分に位置する金薄膜311に、抗体35を担持した有機膜を膜付けし、センシング部Sを形成する。

⑧ガラス板31全体に、5%BSA(bovine serum albumin)-リン酸塩緩衝液(0.01M pH8.0)を用いて37℃、2時間のBSAブ

ロッキング処理を行い、血清アルブミン中の非特異的な部分をブロックして表面プラズモンバイオセンサ3(図2の(a)の方)が完成する。

尚、別の製造方法により、図2の(b)の構造となる様に、表面プラズモンバイオセンサ3を製造しても良い。

【0018】抗原である $\alpha$ -FP( $\alpha$ -Fetoprotein)の検出は、以下の様にして行う(図4参照)。

1. 表面プラズモンバイオセンサ3(図2の(a)または(b))を、 $\alpha$ -FP検出装置Aに装着し、演算器9から出力される電気信号(Is-Ir)/Imを確認しておく。

2. 患者から採った血清を、表面プラズモンバイオセンサ3の、センシング部Sとリファレンス部Rとに被着させる。

3. 被着時点で、本実施例の場合、電気信号Is/Im、Ir/Imの出力値は、各々はね上がるが、患者が肝臓癌である場合、免疫反応が起きるので、図4の(a)に示す様に、演算器9が出力する電気信号(Is-Ir)/Imの値が時間とともに漸増する。また、肝臓癌でない場合、免疫反応が起きないので、図4の(b)に示す様に、演算器9が出力する電気信号(Is-Ir)/Imの値は時間が経過しても殆ど変化しない。

【0019】以下、本実施例の利点を述べる。

(ア) 演算器9が出力する電気信号(Is-Ir)/Imの値の時間的変化を観察して免疫反応の有無を判断している。このため、各種処理の為に用いる溶液に起因する電気信号Is、Irの出力変化を相殺することができ、免疫反応による電気信号Is、Irの差動出力変化のみを検出することができ、正確に免疫反応の有無を判定できる。また、電気信号Imを参照しているので、P偏光ビーム12の強度の経時変化等を相殺する事ができる。

(イ) 患者から採った血清を、表面プラズモンバイオセンサ3の、センシング部Sとリファレンス部Rとに被着させ、電気信号(Is-Ir)/Imの値の時間的変化を観察するだけなので、血清中の $\alpha$ -FPの存在確認に手間や時間がかからず、また、安価に行える。

(ウ) 血清には個体差があり、電気信号Is、Irの出力値はばらつく。しかし、演算器9が出力する電気信号(Is-Ir)/Imの値の時間的変化を観察して免疫反応の有無を判断している所以で不具合は起きない。

【0020】本発明は、上記実施例以外に下記の実施態様を含む。

a. 上記実施例では被センシング物質を抗原、センシング物質を抗体35としたが、逆でも良い。

b. 上記実施例では、溶液との耐腐蝕性の観点から金属薄膜に金を用いたが、誘電率の虚数部の小さい金属であれば他の金属(例えば銀、銅等)を使用しても良い。また、膜厚は、数十nmの範囲で単色光の波長や金属の種

類に応じて選べば良い。

c. プリズム本体33の形状は、直角プリズム以外であっても良い。

d. 表面プラズモンバイオセンサ3の製造方法は、被センシング物質の種類に応じて適宜変更しても良く、また、センサ3に使用する材料は、上記実施例と異なる材料を用いても良い。

e. 表面プラズモンバイオセンサ3の検出感度を向上させる為、光源に変調を加え、この変調光に同期した電気信号を取り出すことができる位相検波回路を採用しても良い。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例に係るα-FP検出装置のブロック図である。

【図2】その検出装置に用いる表面プラズモンバイオセンサの拡大図である。

【図3】その表面プラズモンバイオセンサの製造工程図

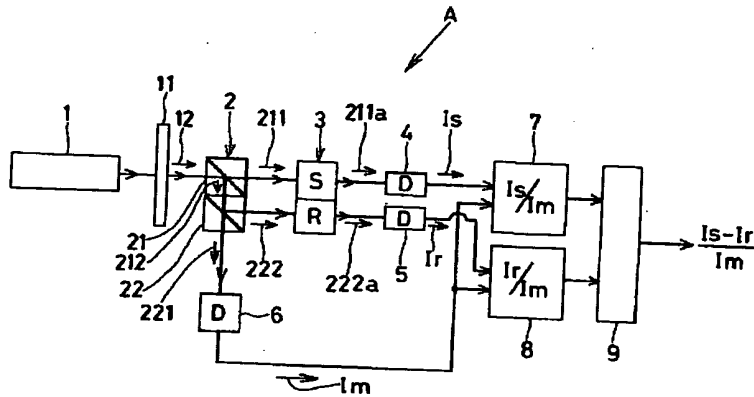
である。

【図4】免疫反応が起きた(a)場合、および起きない(b)場合の各電気信号の強度を示すグラフである。

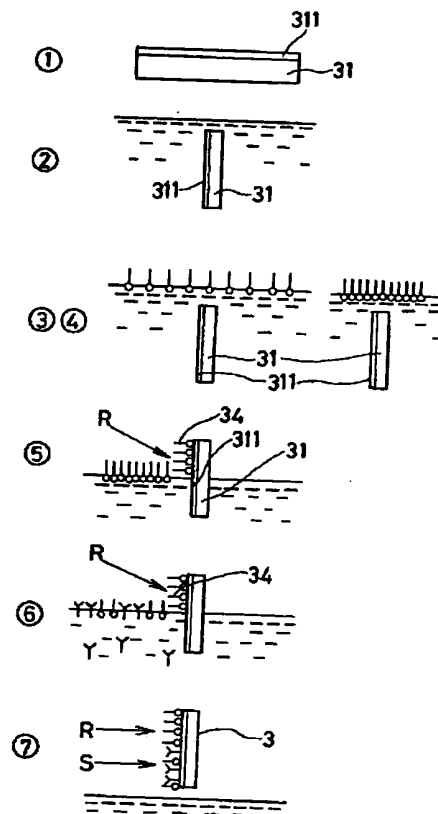
【符号の説明】

- 1 レーザ投光器 (単一光源)
- 2 ビームスプリッタ
- 3 表面プラズモンバイオセンサ
- 12 P偏光ビーム (単色光ビーム)
- 30 プリズム
- 35 抗体 (センシング物質)
- 211 通過光 (分割ビーム)
- 222 反射光 (分割ビーム)
- 310 上面 (一端面)
- 311 金薄膜 (金属薄膜)
- A α-FP検出装置
- R リファレンス部
- S センシング部

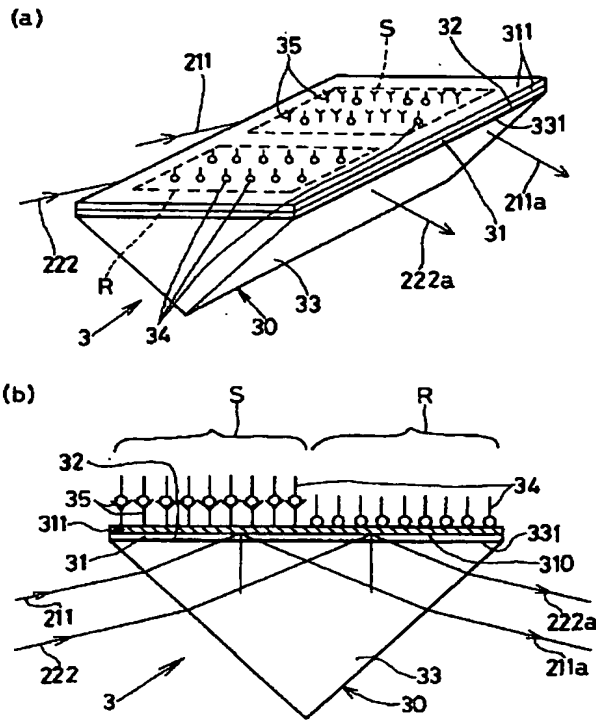
【図1】



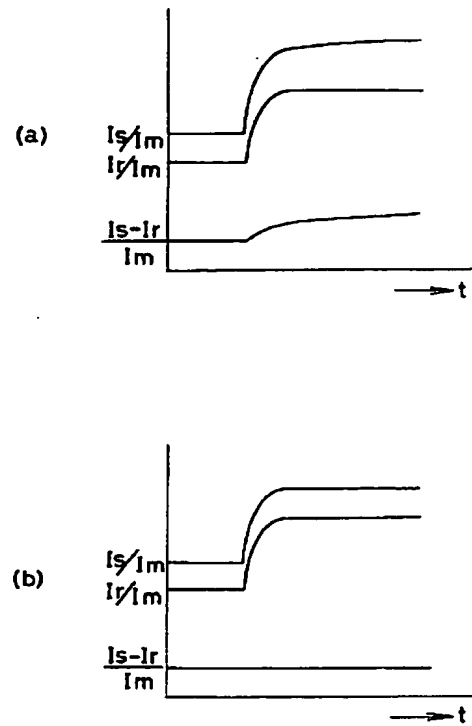
【図3】



【図2】



【図4】



RECEIVED  
FEB 11 2004  
OIP/E/JCWS